

基于药效筛选和正交试验优化温肺降浊方的提取工艺

庞燕梅¹, 周福军², 胡跃强⁴, 单 淇², 梁小娜⁵, 黄启和¹, 廖茂梁², 侯文彬^{2*}, 唐 农^{3*}

1. 天津医科大学, 天津 300070
2. 天津药物研究院, 天津 300193
3. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001
4. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023
5. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: **目的** 通过药效、急毒实验筛选温肺降浊方的提取工艺, 并以正交试验进行优化, 确定温肺降浊方的最佳提取工艺。**方法** 对不同工艺样品进行急性毒性实验, 并以血管性痴呆 (VD) 大鼠的学习和记忆能力的改善程度为药效指标, 综合急毒与药效实验的结果, 筛选出最佳工艺方案; 以多个成分含量和出膏率为指标, 采用正交试验筛选溶剂倍量、提取时间和提取次数的最优水平, 并进行验证。**结果** 急毒实验结果显示所有小鼠均健康存活, 未见明显毒性反应。药效实验结果表明白附片、党参、炙甘草混合水提, 三七、干姜、酒大黄混合醇提为温肺降浊方的最佳提取方案; 最优提取工艺为白附片先煎 2 h, 再入党参、炙甘草加 10 倍水加热回流提取 3 次, 每次 1 h; 三七、干姜、酒大黄加 6 倍 70%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h。**结论** 温肺降浊方能明显改善 VD 模型大鼠的学习和记忆能力, 优选的工艺条件合理可行, 为温肺降浊方的后续开发提供依据。

关键词: 温肺降浊方; 血管性痴呆; 急性毒性; 学习和记忆能力; 正交试验

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)10-2420-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.025

Optimization of extraction process of Wenfei Jiangzhuo Recipe based on pharmacodynamic screening and orthogonal experiment

PANG Yan-mei¹, ZHOU Fu-jun², HU Yue-qiang⁴, SHAN Qi², LIANG Xiao-na⁵, HUANG Qi-he¹, LIAO Mao-liang², HOU Wen-bin², TANG Nong³

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China
3. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China
4. First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China
5. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To screen the extraction process of Wenfei Jiangzhuo Recipe (WJR) by pharmacodynamics and acute toxicity test, and to optimize it by orthogonal experiment to determine the best extraction process of WJR. **Methods** Acute toxicity test was carried out on different WJR samples. The improvement of learning and memory of vascular dementia (VD) rats was used as the efficacy index, and the results of the acute toxicity and efficacy experiments determined the best process plan. Using contents and yield rate as index, orthogonal test was used to screen the amount of solvent, extraction time and extraction times. **Results** The results of acute toxicity test showed that all mice survived without obvious toxicity. The results of pharmacodynamic test showed that the best extraction plan of WJR was as follows: Extracting white prepared lateral root of *Aconite*, *Codonopsis Radix*, and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* with water, and *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Zingiberis Rhizoma*, and wine processing *Rhei Radix*

收稿日期: 2018-01-19

基金项目: 广西卫生和计划生育委员会壮瑶医药院内制剂提升工程项目 (GZZJ16-01); 天津科技支撑计划项目 (15ZCZDSY00470); 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (15JCYBJC29500)

作者简介: 庞燕梅 (1992—), 硕士研究生, 主要从事天然药物化学研究。Tel: 13002215695 E-mail: pym557@163.com

*通信作者 侯文彬, 研究员, 从事中药新药研发工作。E-mail: houwb@tjipr.com

唐 农, 教授, 主任医师, 研究方向为中医药防治痴呆的研究。E-mail: tn9689@126.com

et *Rhizoma* with ethanol. The optimized extraction technology were as follows: The former were 10-fold water reflux extraction for three times and 1 h each time, with white prepared lateral root of *Aconite* first reflux 2 h; The latter were 6-fold 70% ethanol reflux extraction three times and each time 1.5 h. **Conclusion** WJR can significantly improve the learning and memory ability of VD model rats. The optimized extraction conditions are reasonable and feasible, and can provide the basis for the subsequent development of WJR.

Key words: Wenfei Jiangzhuo Recipe; vascular dementia; acute toxicity; learning and memory skills; orthogonal experiment

温肺降浊方 (Wenfei Jiangzhuo Recipe, WJR) 是广西中医药大学第一附属医院的经验方, 由白附片、党参、三七、干姜、酒大黄、炙甘草共 6 味药组成。药学实验和临床研究显示, 该方可用于治疗血管性痴呆 (vascular dementia, VD), 促进神经细胞恢复, 改善痴呆症状^[1]。方中白附片补虚、通气道、散寒止痛; 党参健脾益肺、养血生津; 三七散瘀止血, 其皂苷类成分有明显改善学习记忆和防止阿尔茨海默症的作用^[2]; 干姜温中散寒、回阳通脉、温肺化饮; 酒大黄善清上焦血分热毒; 炙甘草补脾益气、调和诸药。本方中白附片为毒性药材, 需先煎、宜久煎, 谢晓芳等^[3]研究发现附子不同炮制品醇提物比水提物毒性大, 故附子宜水煎, 使其有毒成分双酯型生物碱水解成毒性小、疗效高的单酯型生物碱, 结合广西中医药大学第一附属医院的临床使用经验, 将白附片先煎 2 h, 以达到减毒增效的作用。在我国, 复方制剂的提取工艺多以测定指标成分含量进行筛选^[4-7], 而容易忽略最根本的指标——药效。本课题组拟设计 4 个提取工艺方案, 对各工艺样品进行急性毒性实验和药效实验, 确定出最佳提取方案, 再采用正交试验, 以出膏率和含量为指标进行综合加权评分, 优化 WJR 的提取工艺, 为 WJR 的提取工艺提供合理的依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, UV 检测器, 美国 Agilent 公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, DAD 检测器, 美国 Agilent 公司; Mettler AE50 电子天平, 万分之一, 瑞士梅特勒-托利多公司; Sartorius BT25S 电子天平, 十万分之一, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; SB-3200 DTN 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; WMT-100 型 Morris 水迷宫检测系统, 成都泰盟科技有限公司。

1.2 药材、试剂与样品

白附片 (批号 20160901) 购自四川江油中坝附子科技发展有限公司, 党参 (批号 17050083)、三七 (批号 16040069) 购自安国市同义中药饮片有限

公司, 干姜 (批号 G1610049)、酒大黄 (批号 G1605050)、炙甘草 (批号 G1701023-01) 购自天津市中药饮片厂有限公司, 以上所有药材经天津药物研究院周福军副研究员鉴定均符合《中国药典》2015 年版一部相关规定; 对照品人参皂苷 Rb₁ (Rb₁, 批号 110704-200420)、人参皂苷 Rg₁ (Rg₁, 批号 110703-200726)、芦荟大黄素 (110795-201007) 和甘草酸铵 (批号 110731-200615) 均购自中国食品药品检定研究院; 6-姜酚对照品 (批号 CHB160901) 购自成都克洛玛生物科技有限公司, 以上对照品质量分数均大于 98%; 提取用乙醇为工业乙醇, 提取用水为蒸馏水, 其余所有试剂均为色谱纯或分析纯。

样品: 按照设计的 4 个提取工艺方案 (工艺 1 为全方水提; 工艺 2 为三七用 70%乙醇提取, 其余药材水提; 工艺 3 为白附片、党参、炙甘草水提, 三七用 70%乙醇单独提取, 干姜、酒大药用 70%乙醇混合提取; 工艺 4 为白附片、党参、炙甘草水提, 其余药材用 70%乙醇提取) 提取药材, 浓缩、真空干燥、粉碎成干粉备用, 样品批号分别为 20170822-1、20170822-2、20170822-3、20170822-4。

1.3 动物

健康 SPF 级 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (湘) 2016-0002。

健康 SPF 级昆明小鼠, 体质量 18~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号 SCXK (湘) 2016-0002。

2 方法与结果

2.1 工艺筛选

2.1.1 不同提取工艺样品的小鼠急性毒性实验 小鼠 90 只, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 随机分 9 组, 每组 10 只。禁食不禁水 12 h, 空白对照组 ig 给予生理盐水, 其余 8 组分别给予最大容积的 4 种工艺样品溶液, 每种样品设高、低剂量组, 高剂量组以最大药物配制质量浓度 0.7 g/mL, 最大给药体积 40 mL/kg 给予实验药物生药 81 g/kg; 低剂量组给予实验药物生药 27 g/kg, 单次给药, 观察小鼠的

行为、皮毛、分泌物、排泄物及中毒及死亡情况。
2.1.2 不同提取工艺样品的大鼠抗痴呆 (VD) 实验
 采用大鼠双侧颈总动脉反复夹闭法这一经典造模方法, 模拟 VD 的病理变化^[8]。造模后, 采用 Morris 水迷宫观察 VD 大鼠行为学的变化以测试大鼠的学习记忆能力。Morris 水迷宫由定位航行实验与空间探索实验 2 个部分构成。其中, 定位航行实验利用大鼠会游泳但怕水的天性, 迫使大鼠在水中寻找隐匿的平台避水。通过数天反复训练, 就会形成稳定的空间参考记忆。这些空间参考记忆投射在大脑的海马、纹状体等神经区域, 形成陈旧性记忆。检测指标主要有逃避潜伏期, 是以大鼠从入水至找到平台所需时间衡量空间记忆能力。空间探索实验是通过复合型学习, 使大鼠形成空间参考记忆。空间探索实验是大鼠完成定位航行实验后, 撤走隐匿平台, 记录大鼠在一定时间内穿过原平台所在位置的次数, 评判大鼠空间学习能力。

模型的制备: 用双侧颈总动脉夹闭再灌注方法制备 VD 模型。动物麻醉后手术分离颈总动脉, 用小动脉夹夹闭大鼠双侧颈总动脉。夹闭 5 min, 然后放开 10 min, 如此重复 3 次。缝合皮肤, 待醒后放回笼中正常喂养, 连续 3 d 10 万单位青霉素与 10 万单位链霉素抗感染。假手术组 (空白组) 只切开而不做缺血手术。

分组及给药: 造模 1 周后, 待大鼠手术切口完全愈合, 所有存活大鼠进行第 2 次水迷宫定位航行实验。以假手术组大鼠逃避潜伏期时间的均值为参考值, 计算模型组大鼠平均逃避潜伏期与参考值之差占该鼠的平均逃避潜伏期的比例, 该值大于 20% 为 VD 大鼠。造模成功率为 75%。

将筛选出的模型大鼠随机分为 4 种工艺 WJR 低、高剂量组, 模型组, 每组 10 只, 另设假手术组 (只切开而不做缺血手术), 共 10 组。造模后 1 周低剂量组按生药 5.9 g/kg 体质量 (相当于临床剂量) ig 给药, 高剂量组按生药 11.8 g/kg 体质量 (相当于临床 2 倍剂量) ig 给药。假手术组与模型组 ig 给予相应体积的重蒸水。共给药 28 d。之后采用 Morris 水迷宫实验记录大鼠游泳轨迹等信息, 进行学习记忆能力检测, 包括定位航行实验 (大鼠从入水至找到平台所需时间) 与空间探索实验 (60 s 内大鼠穿过原平台所在位置的次数)。

学习能力和记忆力改善程度的权重均为 0.5, 总改善程度 = 0.5 × 学习能力改善程度 + 0.5 × 记忆力

改善程度, 而改善程度 = (治疗组 - 假手术组) / (模型组 - 假手术组)。

2.1.3 工艺筛选结果

(1) 急毒实验结果: 给药后 1 周内, 均未见小鼠外观、行为活动、精神状态、食欲、大小便等异常反应, 也未见小鼠死亡。处死小鼠, 解剖并仔细观察其主要脏器变化, 未发现脏器肿大、萎缩、坏死等异常现象。

(2) 药效实验结果

学习能力: 以定位航行实验中的逃避潜伏期代表大鼠学习能力。各组大鼠训练阶段每天平均逃避潜伏期前后比较, 各组大鼠逃避潜伏期随训练时间延长均有一定的缩短。与假手术组相比, VD 模型组潜伏期延长, 学习能力降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 VD 模型组比较, WJR 各治疗组潜伏期缩短, 学习能力有所改善, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1。高剂量组优于低剂量组, 呈剂量依赖关系。

记忆能力: 以空间探索实验中跨越平台次数代表大鼠记忆能力, 结果显示, 与假手术组相比, VD 模型组跨越平台次数明显减少, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 VD 模型组比较, 各治疗组依次跨越平台次数明显增高, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1。高剂量组优于低剂量组, 呈剂量依赖关系。

综合评价: 综合急性毒性、学习能力和记忆力总改善程度 (表 1), 比较发现, 在安全性相同的情况下, 工艺 4 的样品抗痴呆效果更好, 故以下实验对工艺 4 进行考察。

表 1 假手术组、VD 模型组与各工艺高剂量给药组的大鼠学习记忆能力的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison on learning and memory abilities between sham-operation group, VD model group and each high-dose group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	潜伏期/s	跨越平台次数	总改善程度/%
假手术	8.96 ± 3.30	8.73 ± 1.22	—
VD 模型	30.52 ± 5.06 ^{▲▲}	2.07 ± 0.96 ^{▲▲}	—
工艺 1	25.53 ± 5.86 [△]	5.79 ± 1.12 [△]	39.50
工艺 2	22.27 ± 4.88 [△]	6.13 ± 1.54 [△]	49.61
工艺 3	24.58 ± 5.16 [△]	5.75 ± 1.24 [△]	41.40
工艺 4	23.70 ± 4.95 [△]	6.87 ± 1.60 [△]	51.85

与假手术组比较: ^{▲▲} $P < 0.01$; 与 VD 模型组比较: [△] $P < 0.05$
^{▲▲} $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ vs VD model group

2.2 提取工艺考察

2.2.1 白附片、党参、炙甘草提取工艺

(1)甘草酸定量测定的色谱条件^[9]: Agilent 1260 色谱仪(UV 检测器); 色谱柱为 Diamonsil Plus 5 μm C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱程序: 0~8 min, 19% 乙腈; 8~35 min, 19%~50%乙腈, 35~36 min, 50%~100%乙腈; 36~40 min, 100%~19%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长为 237 nm; 进样量 10 μL。理论板数按甘草酸铵峰计算不低于 20 000。

(2) 正交试验: 在预实验的基础上, 选取加水倍量 (A)、提取时间 (B)、提取次数 (C) 为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 因素与水平见表 2。按日处方量称取白附片、党参和炙甘草药材共 9 份, 照正交设计表安排进行提取, 将白附片先加相应倍量水回流提取 2 h, 再入党参和炙甘草加相应倍量水加热回流提取, 滤过, 合并滤液, 得供试液。精密吸取一定量供试液于 25 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 以 0.45 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 得 9 批供试品溶液。

以出膏率和炙甘草药材中甘草酸的含量为评价指标, 采用综合评分法进行数据处理, 权重系数分别为 0.3 和 0.7。出膏率=干膏质量/药材质量, 甘草酸含量=甘草酸质量/炙甘草药材质量; 综合评分=(出膏率/出膏率最大值)×30+(甘草酸含量/甘草酸含量最大值)×70。实验设计和方差分析结果见表 2、3。由表 2、3 可知各因素对综合评分的影响大小顺序为 C>A>B, 其中 C (提取次数) 对提取结果有显著性影响 (P<0.05)。综合直观分析表与方差分析表, 得到最优提取工艺为 A₃B₃C₃, 结合因素影响大小和实际生产成本考虑, 优选出最佳提取工艺为 A₂B₁C₃, 即白附片加 10 倍水先煎 2 h, 再入党参和炙甘草加 10 倍水加热回流提取 3 次, 每次 1 h。

(3) 验证实验: 为确保该工艺的稳定性, 根据优选结果提取 3 批样品进行实验。结果见表 4。所有指标的均值与正交试验结果的较高数据接近, 且 RSD 均小于 3%, 表明优选的工艺条件稳定、可行。

2.2.2 三七、干姜、酒大黄提取工艺

(1) R_{g1}、R_{b1} 及 6-姜辣素、芦荟大黄素定量测定的色谱条件^[10-13]: Agilent 1260 色谱仪 (DAD 检测器); 色谱柱为 Diamonsil Plus 5 μm C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗

表 2 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 2 Design and Results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A/倍	B/h	C	D	出膏率/%	甘草酸/%	综合评分
1	8(1)	1.0(1)	1(1)	(1)	24.17	0.36	39.77
2	8(1)	1.5(2)	2(2)	(2)	34.72	0.75	70.55
3	8(1)	2.0(3)	3(3)	(3)	36.83	1.14	95.84
4	10(2)	1.0(1)	2(2)	(3)	33.25	0.92	79.91
5	10(2)	1.5(2)	3(3)	(1)	40.00	1.11	96.25
6	10(2)	2.0(3)	1(1)	(2)	27.50	0.42	45.46
7	12(3)	1.0(1)	3(3)	(2)	38.56	1.16	97.84
8	12(3)	1.5(2)	1(1)	(3)	27.61	0.42	45.57
9	12(3)	2.0(3)	2(2)	(1)	36.83	1.17	97.62
K ₁	206.16	217.52	130.80	233.64			
K ₂	221.62	212.37	248.08	213.85			
K ₃	241.03	238.92	289.93	221.32			
R	34.87	26.55	159.13	19.79			

表 3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	203.519 6	2	3.056 7	
B	132.153 9	2	1.984 9	
C	4 536.486 4	2	68.135 0	P<0.05
D(误差)	66.580 8	2		

F_{0.05}(2, 2) = 19.00

表 4 验证实验结果

Table 4 Results of verification

试验号	出膏率/%	甘草酸/%	综合评分
1	36.02	1.09	91.95
2	36.16	1.11	93.32
3	35.74	1.08	91.29

脱程序为 0~25 min, 20%乙腈; 25~65 min, 20%~40%乙腈; 65~70 min, 40%乙腈; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长: R_{g1}、R_{b1} 为 203 nm, 6-姜辣素为 280 nm, 芦荟大黄素为 254 nm; 进样量为 10 μL; 理论板数按 R_{g1} 峰计算不低于 14 000。

(2) 三七、干姜、酒大黄提取溶剂的考察: 加入 6 倍量不同体积分数的乙醇提取药材 2 次, 每次 1.5 h, 测定其 R_{g1}、R_{b1}、6-姜辣素以及芦荟大黄素的含量, 结果见表 5。结果发现与酒大黄药材用 70% 和 80%乙醇提取效果相当且优于低体积分数乙醇的提取效果, 而三七和干姜用 70%乙醇提取效果最好, 80%乙醇提取效果下降, 结合实际生产成本及 3 味

表 5 不同体积分数乙醇对药材的提取效果

Table 5 Extraction results of different volumes of ethanol

乙醇/%	提取率/%		
	Rg ₁ +Rb ₁	6-姜辣素	芦荟大黄素
30	4.52	0.25	0.07
40	5.23	0.36	0.08
50	5.69	0.45	0.10
60	5.97	0.52	0.12
70	6.10	0.55	0.14
80	6.02	0.43	0.15

药材的提取效果, 选择 70%乙醇为提取溶剂。

(3) 三七、干姜、酒大黄的提取正交试验: 在预实验的基础上, 选取溶剂倍量(A)、提取时间(B)、提取次数(C)为考察因素, 每个因素选取 3 个水平, 因素与水平见表 6。按日处方量称取三七、干姜和酒大黄药材共 9 份, 照正交设计表用 70%乙醇进行提取, 滤过, 合并滤液, 得供试液。精密吸取一定量供试液于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 以 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 得 9 批供试品溶液。以 Rg₁、Rb₁ 及 6-姜辣素、芦荟大

表 6 L₉(3⁴) 正交试验设计与结果

Table 6 Design and results of L₉(3⁴) orthogonal test

试验号	A/倍	B/h	C	D	出膏率/%	ω ₁ /%	ω ₂ /%	ω ₃ /%	综合评分
1	6 (1)	1.0 (1)	1 (1)	(1)	11.67	4.48	0.37	0.11	56.90
2	6 (1)	1.5 (2)	2 (2)	(2)	20.00	6.07	0.56	0.14	81.25
3	6 (1)	2.0 (3)	3 (3)	(3)	20.56	7.36	0.67	0.16	95.39
4	8 (2)	1.0 (1)	2 (2)	(3)	18.73	5.90	0.51	0.15	79.07
5	8 (2)	1.5 (2)	3 (3)	(1)	21.65	7.05	0.60	0.19	95.28
6	8 (2)	2.0 (3)	1 (1)	(2)	15.00	5.23	0.46	0.12	68.33
7	10 (3)	1.0 (1)	3 (3)	(2)	19.44	6.92	0.63	0.16	91.15
8	10 (3)	1.5 (2)	1 (1)	(3)	14.58	5.38	0.47	0.11	67.26
9	10 (3)	2.0 (3)	2 (2)	(1)	20.78	6.06	0.61	0.14	84.39
K ₁	233.54	227.12	192.49	236.57					
K ₂	242.68	243.79	244.71	240.73					
K ₃	242.80	248.11	281.82	241.72					
R	9.26	20.99	89.33	5.15					

黄素的含量以及出膏率为评价指标, 采用综合评分法进行数据处理, 由于方中三七为君药、干姜为臣药, 酒大黄为佐药, 故 Rg₁ 和 Rb₁ 的总含量 (ω₁)、6-姜辣素的含量 (ω₂) 和芦荟大黄素的含量 (ω₃) 权重系数分别为 0.35、0.30、0.25, 出膏率权重为 0.10。综合评分=(出膏率/出膏率最大值)×10+(ω₁/ω_{1max})×35+(ω₂/ω_{2max})×30+(ω₃/ω_{3max})×25。实验设计和方差分析结果见表 6、7。

表 7 方差分析结果

Table 7 Results of variance analysis

因素	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	18.811 3	2	3.778 4	
B	81.903 5	2	16.450 8	
C	1 342.658 8	2	269.681 2	P<0.01
D (误差)	4.978 7	2		

F_{0.01}(2, 2)=99.00

由表 6、7 可知, 各因素对综合评分的影响大小顺序为 C>B>A, 其中 C 对提取结果有显著性影响 (P<0.05)。综合直观分析表与方差分析表, 得到最优提取工艺为 A₃B₃C₃, 结合因素影响大小和实际生产成本考虑, 优选出最佳提取工艺为 A₁B₂C₃, 即加入 6 倍 70%乙醇加热回流提取 3 次, 每次 1.5 h。

(4) 验证实验: 为确保该工艺的稳定性, 根据优选结果提取 3 批样品进行实验, 结果见表 8。所有指标的均值与正交试验结果的较高数据接近, 且 RSD 均小于 3%, 表明优选的工艺条件稳定、可行。

表 8 验证实验结果

Table 8 Results of verification

试验号	出膏率/%	ω ₁ /%	ω ₂ /%	ω ₃ /%	综合评分
1	24.27	6.89	0.67	0.15	92.88
2	24.53	6.92	0.67	0.15	93.40
3	24.00	7.02	0.65	0.15	93.22

3 讨论

血管性痴呆是由脑血管病(如脑梗死、脑出血、皮层下白质的缺血性改变)引起的有痴呆表现的临床综合征,是一种常见的老年痴呆病。由于其复杂的发病机制,目前尚无治疗血管性痴呆的特效药。WJR 是广西中医药大学第一附属医院治疗 VD 的临床经验方,主张“从肺论治血管性痴呆”^[14],其疗效好、安全可靠。

本实验设计的 4 个工艺方案提取的样品对 VD 大鼠的学习和记忆能力均能显著提高。对比不同溶剂与配伍提取样品的药效实验,工艺 4 的效果更好,可能与三七、干姜、酒大黄混合提取后 Rg₁、Rb₁ 以及 6-姜辣素的含量增大有关。

生附子经过炮制能大大降低其毒性,而白附片的毒性较黑顺片、盐附子低,入药更安全^[15-16]。附子多与甘草或蜂蜜配伍,而附子配伍炙甘草能达到减毒的效果,其原因可能是两者合煎过程中有大量双酯型生物碱因结合而减少^[17]。

对水提组正交试验各样品的双酯型生物碱进行含量测定时,所有样品均并未检出新乌头碱和次乌头碱,而乌头碱在受到阴性干扰的情况下,按其峰面积计算,所有样品的乌头碱含量按日服剂量计均低于 200 μg,含量属于安全范围^[18]。对药理实验样品和正交 3 批验证的样品用薄层色谱法进行乌头碱限量检查时,在与对照品色谱相应的位置上,供试品色谱斑点颜色均不深于对照品斑点颜色,而药理样品的小鼠急性毒性结果也表明了乌头碱含量在安全范围内。本实验优选工艺条件时综合考虑急毒、药效及多个成分含量,工艺可行、合理、稳定,为 WJR 的后续开发提供了可靠的依据。

参考文献

- [1] 胡跃强,赖菁菁,汪庭龙,等. 温肺降浊方对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1804-1807.
- [2] 曹国琼,过利敏,张海静,等. 三七皂苷类成分治疗阿尔茨海默病研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(12): 2647-2651.
- [3] 谢晓芳,彭成,易进海,等. 附子不同炮制品提取物急性毒性的比较研究 [J]. 中药与临床, 2012, 3(3):

29-33.

- [4] 徐玉玲,白婷钰,付春梅,等. 三七配伍丹参对丹参中成分提取溶出的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(24): 4357-4363.
- [5] 余皎,陈娇,周文杰,等. 基于抗炎解热药效的小儿温热口服液中心复合设计-效应面法提取工艺优化研究 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3632-3638.
- [6] 崔婷婷,黄晴雯,李心雨,等. 2 次旋转正交设计优化锁阳总糖提取工艺 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4003-4008.
- [7] 于淼. 文殊兰种子中总生物碱提取方法的比较 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1089-1095.
- [8] 马大勇,范吉平,朱陵群,等. 3 种拟血管性痴呆大鼠模型的比较 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(12): 832-835.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [10] 郭冲,郜玉钢,臧埔,等. HPLC 法同时测定人参及其制剂中 16 种人参皂苷 [J]. 中草药, 2014, 45(14): 2009-2013.
- [11] 崔秀明,徐璐珊,王强,等. 三七药材中几种单体皂苷的含量测定 [J]. 中草药, 2004, 35(12): 91-93.
- [12] 杨冰月,李敏,施佳,等. 半夏及其炮制品姜半夏 HPLC 特征指纹图谱系统性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 652-658.
- [13] 曾德贵,杨春燕,吴夏茹. 芦荟大黄素的提取分离与含量测定 [J]. 现代医药卫生, 2011, 27(12): 1768-1770.
- [14] 赵清山,王清碧,唐农,等. 唐农教授从肺论治血管性痴呆的经验 [J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(1): 6-8.
- [15] 刘芳. 江油附子及其炮制品的 HPLC 图谱比较及三种双酯型生物碱的含量测定 [A] // 中华中医药学会第五届中药炮制分会学术会议论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会中药炮制分会, 2005.
- [16] 贾雪岩,林华,沈玉巧,等. 附子新型炮制品中乌头类生物碱测定及其强心作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 224-229.
- [17] 林彦君,游宇,季宁平,等. HPLC-Q-TOF/MS 指纹技术对比分析附子配伍炙甘草前后化学组分变化 [J]. 中草药, 2014, 45(11): 1556-1560.
- [18] 阳长明,马秀璟,张永文,等. 关于中成药质量标准中乌头碱限量检查的探讨 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(1): 18-21.